

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



A

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 49/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/25954
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	29. August 1996 (29.08.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/00538 (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Februar 1996 (09.02.96) (30) Prioritätsdaten: 195 08 049.1 23. Februar 1995 (23.02.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ALBAYRAK, Celal [DE/DE]; Paul-Lincke-Ufer 42/43, D-10999 Berlin (DE). RÖSSLING, Georg [DE/DE]; Oranienburger Chaussee 60C, D-13465 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> <div style="font-size: 2em; margin-top: 20px;">= US 6,106,807</div>	
(54) Title: USE OF METHYLENE MALONIC DIESTER DERIVATIVES IN THE PRODUCTION OF GAS-CONTAINING MICROPARTICLES FOR USE IN ULTRASOUND DIAGNOSTICS, AND AGENTS CONTAINING THESE PARTICLES (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON METHYLENMALONDIESTERDERIVATEN ZUR HERSTELLUNG VON GASHALTIGEN MIKROPARTIKELN FÜR DIE ULTRASCHALLDIAGNOSTIK, SOWIE DIESE PARTIKEL ENTHALTENDE MITTEL (57) Abstract <p>The invention concerns the use of methylene malonic diester derivatives of general formula (I), in which R¹ and R² have different meanings, in the production of gas-containing particles for use in ultrasound diagnostics, and ultrasound contrast agents containing these particles.</p> <div style="text-align: right;"> $\text{H}_2\text{C}=\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{CO}_2\text{R}^1 \\ \searrow \text{CO}_2\text{R}^2 \end{array} \quad (\text{I})$</div>			
(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von Methylenmalondiesterderivaten der allgemeinen Formel (I), worin R¹ und R² unterschiedliche Bedeutung haben zur Herstellung von gashaltigen Partikeln für die Ultraschalldiagnostik, sowie diese Partikel enthaltende Ultraschallkontrastmittel.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LT	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

**Verwendung von Methylenmalondiesterderivaten
zur Herstellung von gashaltigen Mikropartikeln für die
Ultraschalldiagnostik, sowie diese Partikel enthaltende Mittel**

5

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, daß heißt die Verwendung von unsymmetrischen bzw. symmetrischen Methylenmalondiesterderivaten zur Herstellung von gashaltigen Mikropartikeln sowie diese Partikel enthaltende Kontrastmittel für die Ultraschalldiagnostik.

10

Die Ultraschalldiagnostik hat in der Medizin wegen der komplikationslosen einfachen Handhabung sehr breite Anwendung gefunden. Ultraschallwellen werden an Grenzflächen von unterschiedlichen Gewebearten reflektiert. Die dabei entstehenden Echosignale werden elektronisch verstärkt und sichtbar gemacht. Die Darstellung von Blutgefäßen und inneren Organen mittels Ultraschall erlaubt im allgemeinen nicht die Darstellung des darin vorhandenen Blutflusses. Flüssigkeiten, insbesondere Blut, liefern nur dann Ultraschallkontrast, wenn Dichte- und Kompressibilitätsunterschiede zur Umgebung bestehen. Als Kontrastmittel werden in der medizinischen Ultraschalldiagnostik z.B. Gase enthaltende oder Gase produzierende Substanzen verwendet, da der Impedanzunterschied zwischen Gas und umgebendem Blut wesentlich größer ist, als der zwischen Flüssigkeiten oder Festkörpern und Blut (Levine R.A., J. Am. Coll. Cardiol. 3: 28, 1989; Machi I.J. CU 11: 3, 1983).

15

20

25

30

35

Es ist bekannt, daß durch periphere Injektionen von Lösungen, die feine Gasblasen enthalten, cardiale Echokontraste erzielt werden können (Roelandt J, Ultrasound Med. Biol. 8: 471-492, 1982). Diese Gasblasen werden in physiologisch verträglichen Lösungen z.B. durch Schütteln, andere Agitation oder durch Zusatz von Kohlendioxid erhalten. Sie sind jedoch hinsichtlich Anzahl und Größe nicht standardisiert und können nur unzulänglich reproduziert werden. Auch sind sie in der Regel nicht stabilisiert, so daß ihre Lebensdauer gering ist. Ihre mittleren Durchmesser liegen meist über Erythrocytengröße, so daß keine Lungenkapillarpassage mit nachfolgender Kontrastierung von Organen wie linkes Herz, Leber, Niere oder Milz möglich ist.

Darüber hinaus eignen sie sich nicht für Quantifizierung, da sich das von ihnen erzeugte Ultraschallecho aus mehreren, nicht voneinander zu trennenden Prozessen wie Blasenentstehung, Koaleszenz und Auflösung zusammensetzt. So ist es z.B.

nicht möglich, mit Hilfe dieser Ultraschall-Kontrastmittel über die Messung des Kontrastverlaufs im Myokard Aussagen über die Transitzeiten zu gewinnen. Hierzu sind Kontrastmittel notwendig, deren Streukörper eine ausreichende Stabilität aufweisen.

5

In der EP O 131 540 ist die Stabilisierung der Gasblasen durch Zucker beschrieben. Damit wird zwar die Reproduzierbarkeit und Homogenität des Kontrasteffektes verbessert, eine Lungenpassage überstehen diese Blasen jedoch nicht.

10

In den EP O 122 624 und O 123 235 wird beschrieben, daß der gasblasenstabilisierende Effekt von Zuckern, Zuckeralkoholen und Salzen durch Zusatz von grenzflächenaktiven Substanzen verbessert wird. Eine Lungenkapillargängigkeit und die Möglichkeit zur Darstellung des arteriellen Gefäßschenkels sowie verschiedener Organe wie Leber oder Milz ist bei diesen Ultraschallkontrastmitteln gegeben. Der Kontrasteffekt ist hierbei jedoch auf das Gefäßlumen beschränkt, da die Bläschen nicht von den Gewebezellen aufgenommen werden.

15

Keines der beschriebenen Ultraschall-Kontrastmittel verbleibt längere Zeit unverändert im Körper. Eine Organdarstellung mit ausreichender Signalintensität durch selektive Anreicherung nach i.v. Gabe oder Quantifizierung ist mit diesen Mitteln nicht möglich.

20

Eine Verkapselung von Gasen, wie beispielsweise Luft als Ultraschall-Kontrastmittel wird in der EP O 224 934 beschrieben. Das hierbei verwendete Wandmaterial besteht aus Protein, insbesondere menschliches Serumalbumin mit den bekannten allergenen Eigenschaften, zu denen durch eine Denaturierung cytotoxische Effekte hinzukommen können.

25

In der EP O 327 490 und EP O 458 745 werden gasenthaltende Mikropartikel für die Ultraschall-Diagnostik auf der Basis von biologisch abbaubaren, synthetischen Materialien beschrieben. Diese Mittel weisen eine ausreichende in-vivo Lebensdauer auf und werden intravenöser Applikation intrazellulär im Retikuloendotheliales System und damit auch in der Leber oder Milz angereichert.

30

35

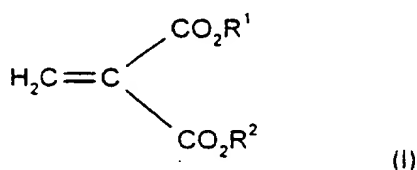
Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es Kontrastmittel für die Ultraschalldiagnostik bereitzustellen, die die Nachteile des Standes der Technik

überwinden, d.h. Ultraschall-Kontrastmittel auf der Basis von Mikropartikeln zu entwickeln, die

- einen deutlichen Kontrast zum umgebenden Gewebe liefern,
- 5 • die so klein und stabil sind, daß sie ohne wesentlichen Gasverlust und im wesentlichen quantitativ die linke Herzhälfte nach intravenöser Applikation erreichen,
- gute Verträglichkeit aufweisen und kein allergenes Potential besitzen,
- in Wasser oder Blut nicht miteinander verklumpen und
- 10 • sich schnell und einfach herstellen lassen.

Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Es wurde gefunden, daß gasgefüllte Partikel, bestehend aus polymerisierten
15 unsymmetrischen bzw. symmetrischen Methylenmalonester der allgemeinen Formel I

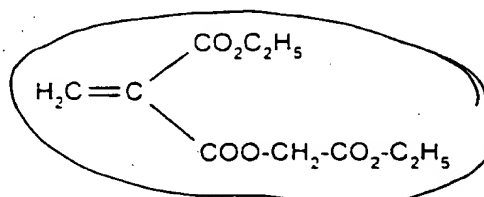


20 worin

die Reste R^1 und R^2 gleich oder verschieden sein können und gesättigte oder ungesättigte, 1 bis 8 Kohlenstoffatome enthaltende Gruppen bedeuten, die gegebenenfalls Sauerstoffatome (Ethergruppen) und Carboxylgruppen (Ester) enthalten, hervorragend als Kontrastmittel für die Ultraschalldiagnostik geeignet
25 sind.

Als Reste R^1 und R^2 seien beispielhaft genannt die CH_3 -, C_2H_5 -, $n\text{-C}_3\text{H}_7$ -, $\text{iso-C}_3\text{H}_7$ -, $n\text{-C}_4\text{H}_9$ -, $\text{iso-C}_4\text{H}_9$ -, $n\text{-C}_5\text{H}_{11}$ -, $n\text{-C}_6\text{H}_{13}$ -, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ -, $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$ -, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ -, $\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$ -, $\text{C}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_5$ -, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ -, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ - und
30 die Allylgruppe, wobei R^1 und R^2 unabhängig voneinander gleich oder verschieden sein können.

Vorzugsweise wird als Methylenmalonester



verwendet.

Als in den Partikeln enthaltene Gase kommen Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Edelgase, Kohlendioxid und Fluorkohlenwasserstoffe infrage.

5

Die Partikel haben eine mittlere Größe im Bereich von 500nm bis 7µm.

Entsprechende Mittel haben insbesondere den Vorteil, daß diese schneller in-vivo abgebaut werden und die Abbauprodukte toxikologisch unbedenklich sind.

10

Da die Wanddicke durch die Herstellungsprozesse beeinflussbar ist, kann man Partikel erzeugen, deren Schwingungsmoden sich durch das Schallfeld anregen lassen, somit eine weitere zusätzliche Komponente zu der Kontrastierung zukommt.

15

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Partikel.

20

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Partikel auf Basis von unsymmetrischen bzw. symmetrischen Methylenmalonestern erfolgt, indem man den jeweils gewünschten monomeren Methylenmalonester in einer wäßrigen Gas-gesättigten Pufferlösung, die gegebenenfalls eine oder mehrere oberflächenaktive Substanz(en) enthält, mit einem Rührer dispergiert, nach erfolgter Polymerisation (ca. 2 - 6 Stunden) die erhaltenen Partikel abtrennt, gegebenenfalls mit Wasser wäscht, anschließend in einem pharmazeutisch akzeptablen Suspensionsmedium aufnimmt und gefriergetrocknet.

25

Als gegebenenfalls dem Reaktionsprozess zugeführte oberflächenaktive Substanzen kommen vorzugsweise infrage Substanz(en) aus der Gruppe der Poloxamere®, Polysaccharide, Polysorbate, Saccharose Mono oder Diester, Polyethylenglykolalkylether sowie deren Gemische.

30

Der pH-Wert der wäßrigen gasgesättigten Pufferlösung liegt vorzugsweise zwischen 5 und 8. Die Abtrennung der Partikel erfolgt mittels Flotation.

35

Die abgetrennten Partikel werden anschließend gewünschtenfalls gewaschen, in einem Suspensionsmedium resuspendiert und lyophilisiert. Als Suspensionsmedium eignet sich Wasser für Injektionszwecke gegebenenfalls mit einem Zusatz von Kochsalz und/oder Glucose und/oder Mannitol und/oder Lactose, das

gegebenenfalls zusätzlich eine oberflächenaktive Substanz, wie z.B. Polysaccharide, Polysorbate, Poloxamere®, Saccharose Mono- oder Diester- oder Polyethylenglycolalkylether sowie deren Gemische enthält.

- 5 Die Herstellung der gebrauchsfertigen, injizierbaren Ultraschallkontrastmittel aus den gefriergetrockneten Partikeln, erfolgt durch Resuspendieren des Lyophilisats in einem pharmazeutisch akzeptablen Suspensionsmedium wie z.B. Wasser p.i., wäßrige Lösungen eines oder mehrerer anorganischer Salze wie physiologische Elektrolyt-Lösungen und Pufferlösungen wie z.B. Tyrode, wäßrige Lösungen von
- 10 Mono- oder Disacchariden wie Glucose oder Lactose, Zuckeralkoholen wie Mannit, die gegebenenfalls zusätzlich noch eine oberflächenaktive Substanz z.B. aus der Gruppe der Polysorbate oder Polysaccharide oder Polyvinylpyroliden oder Polyethylenglycolylether, Saccharose Mono und Diester oder Substanzen aus der Gruppe der Poloxamere® oder deren Gemischen und/oder einem physiologisch
- 15 verträglichen mehrwertigen Alkohol wie Glycerin, enthalten. Bevorzugtes Suspensionsmedium ist für Injektionszwecke geeignetes Wasser. Die Gesamtkonzentration der gegebenenfalls gelösten Stoffe beträgt 0 - 15 Gewichts-Prozent.
- 20 Ein alternatives Verfahren zur Herstellung der gebrauchsfertigen, injizierbaren Zubereitungen besteht darin, daß bei einem erfindungsgemäßen Verfahren - zur Herstellung der Partikel - auf die abschließende Gefriertrocknung verzichtet wird.
- Um die Sicherheit der Applikation zu erhöhen, kann unmittelbar vor Injektion eine
- 25 Filtration der Suspension durchgeführt werden.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der näheren Erläuterung des Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

- 30 Die Herstellung der als Ausgangsverbindung verwendeten Methylenmalonesterderivaten sind literaturbekannt und beispielsweise beschrieben in DE-PS 27 34 082; US-PS 4,931,584, J. Org. Chem. 48, 3603 (1983) sowie in Makromolekulare Chemie 107, 4-5 (1967).

Beispiel 1

1 ml Diethylmethylidenemalonat werden in 100 ml 0,01 m Phosphatpuffer pH 7.4, die 1 % Dextran-8 (Serva, Feinbiochemica GmbH & Co.) enthält, mit einem Rührer (Dispermat-FT, VMA-Getzmann GmbH) bei 20° C, 60 Minuten lang bei 10000 upm dispergiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in einem Kolben, versehen mit einem Rührer überführt und 6 Stunden lang bei Raumtemperatur unter Rühren (300 upm) weiter polymerisiert.

Die ultraschallaktiven, gasgefüllten Nano- oder Mikropartikel werden durch Flotieren abgetrennt, mehrmals mit Wasser oder 0.9 % NaCl Lösung gewaschen und in 200 ml einer wäßrigen Lösung von 1 % Dextran-8 aufgenommen. Die Partikel haben eine durchschnittliche Größe von 800 nm und zeigen hervorragende Ultraschallaktivitäten. So beträgt der in einem in-vitro Versuch ermittelte Rückstreuoeffizient $\alpha_s = 7,8 \times 10^{-2}$ dB/cm bei 5 mHz, $C = 2,2 \cdot 10^{-7}$ T/ml.

Beispiel 2

Es wird wie in Beispiel (1) verfahren, wobei das Puffersystem ein pH-Wert von 8.0 aufweist und Dextren-8 durch Dextran-10 ersetzt wird. Die Partikel besitzen eine durchschnittliche Größe von 700 nm.

Die Partikel werden in 150 ml, 5 %iger Mannitol-Lösung, die 0,1 % Dextran enthält, aufgenommen.

Beispiel 3

Es wird wie in Beispiel (1) verfahren, wobei das Puffersystem ein pH-Wert von 7.4 aufweist und Dextren-8 durch Polyvinylpyrrolidon Kollidon® PF-17 ersetzt wird. Die Partikel besitzen eine durchschnittliche Größe von 1.3 µm. Die Partikel werden in 150 ml, 5 % Glucoselösung, die 0,1 % Kollidon® PF-17 enthält, aufgenommen.

Beispiel 4

Es wird wie in Beispiel (1) verfahren, wobei Dextran-8 durch die Brij®-35 ersetzt wird. Die Partikel besitzen eine durchschnittliche Größe von 2.0 µm.

Die Partikel werden in 150 ml, 0,5 %iger Glucoselösung, die 1 % Brij®-35 enthält, aufgenommen.

Beispiel 5

Es wird wie in Beispiel (1) verfahren, wobei Dextran-8 durch die Brij®-96 ersetzt wird. Die Partikel besitzen eine durchschnittliche Größe von 2.0 µm.

Die Partikel werden in 150 ml, 0,1 %iger Brij®-96-Lösung aufgenommen.

Beispiel 6

Es wird wie in Beispiel (1) verfahren, wobei Dextran-8 durch die 2% Tween®-20 wird.

- 5 Die Partikel werden in 150 ml, 5 %iger Mannitol-Lösung, die 0,1 % Tween®-20 enthält aufgenommen. Die Partikel besitzen eine durchschnittliche Größe von 1,0 μm .

Beispiel 7

- 10 1 ml Monomer "1-Ethoxycarbonyl, 1-Ethoxycarbonylmethylene oxycarbonylthane" werden in 100 ml wäßrige Phosphatpuffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0.066 N, pH 5,5), die 1 % Dextran-8 (Serva, Feinbiochemica GmbH & Co.) enthält, mit einem Rührer (Disperment FT, Getzmann GmbH), bei 20 °C, 60 Minuten lang bei 8000 upm dispergiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in einem Kolben, versehen mit einem Rührer überführt und 6 Stunden lang bei Raumtemperatur unter Rühren (300 upm) weiter polymerisiert. Die ultraschallaktiven bzw. gasgefüllten Nano oder
- 15 Partikel werden entweder durch flotieren oder abzentrifugieren abgetrennt, mit Wasser mehrmals gewaschen und in 200 ml, 5 % Mannitol-Lösung, die 0,1 % Dextran-8 enthält, aufgenommen.
- 20 Die Partikel besitzen eine durchschnittliche Größe von 1.5 μm und zeigen hervorragende Ultraschallaktivitäten. In einem in-vitro Experiment wurde ein Rückstreuoeffizient von $\alpha_s = 1,5 \times 10^{-1} \text{ dB/cm}$ bei 5 mHz, $C = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ T/ml}$ gemessen.

Beispiel 8

Es wird wie in Beispiel (7) verfahren, wobei das Phosphatpuffer ein pH-Wert von 6.0 hat. Die Partikel besitzen eine durchschnittliche Größe von 1,0 μm .

Beispiel 9

- 30 Es wird wie in Beispiel (7) verfahren, wobei das Phosphatpuffer ein pH-Wert von 6.5 hat. Die Partikel besitzen eine durchschnittliche Größe von 1,2 μm .

Beispiel 10

- Es wird wie in Beispiel (7) verfahren, wobei das Phosphatpuffer durch die Zitronensäure (0,1 m)/ Na_2HPO_4 (0,2 m) Puffer von pH-Wert 5,5 ersetzt wird.
- 35 Die Partikel besitzen eine durchschnittliche Größe von 1,0 μm .

Beispiel 11

Es wird wie in Beispiel (7) verfahren, wobei Dextran-8 durch Dextran-10 ersetzt wird. Die Partikel besitzen eine mittlere Größe von 0,8 μm . Die Partikel werden in 200 ml, 5 %iger Glucoselösung, die 5 % Dextran-10 enthält aufgenommen.

5

Beispiel 12

Es wird wie in Beispiel (7) verfahren, wobei Dextran-8 durch 3 % Polyvinylpyrrolidon PF-17 ersetzt wird. Die Partikel weisen eine mittlere Größe von 1,5 μm auf. Die Partikel werden in 200 ml, 5 %iger Mannitol-Lösung, die 0,5 % Kollidon[®] PF-17 aufgenommen.

10

Beispiel 13

Es wird wie in Beispiel (7) verfahren, wobei die Dextran-8 durch die 3 % Tween[®]-80 ersetzt wird. Die Partikel besitzen eine mittlere Größe von 1,2 μm . Die Partikel werden in 200 ml, 5 % Glucoselösung aufgenommen.

15

Beispiel 14

Es wird wie in Beispiel (7) verfahren, wobei Dextran-8 durch die 2 % Tween[®]-40 ersetzt wird. Die Partikel besitzen eine mittlere Größe von 1,0 μm . Diese Partikel werden in 150 ml, 5 %iger Mannitol-Lösung aufgenommen.

20

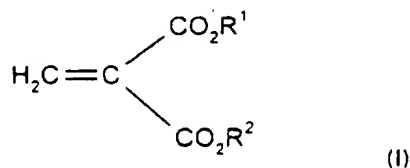
Beispiel 15

Es wird wie in Beispiel (7) verfahren, wobei Dextran-8 durch die 3 % Pluronic[®] F 68 ersetzt wird. Die Partikel besitzen eine mittlere Größe von 1,8 μm . Die Partikel werden in 150 ml, 5 % Mannitol-Lösung aufgenommen.

25

Patentansprüche

1. Verwendung von Methylenmalondiesterderivaten der allgemeinen Formel I



worin

die Reste R¹ und R² gleich oder verschieden sein können und gesättigte oder ungesättigte, 1 bis 8 Kohlenstoffatome enthaltende Gruppen bedeuten, die gegebenenfalls Sauerstoffatome (Ethergruppen) und Carboxylgruppen (Ester) enthalten zur Herstellung von gasenthaltenden Partikel für die Ultraschalldiagnostik.

2. Verwendung von Methylenmalondiesterderivaten der allgemeinen Formel I nach Anspruch 1, worin die Reste R¹ und R² eine Methyl-, Ethyl-, iso-Propyl-, Propyl-, Butyl-, Pentyl-, Allyl-, Propinyl-, Methoxymethyl-, Ethoxyethyl-, Ethoxycarbonylmethyl- oder Ethoxycarbonylpropylgruppe bedeuten.

3. Mittel für die Ultraschalldiagnostik enthaltend gashaltige Partikel aus polymerisierten symmetrischen oder unsymmetrischen Methylenmalondiesterderivaten der allgemeinen Formel I.

4. Verfahren zur Herstellung von Partikel aus polymerisierten unsymmetrischen oder symmetrischen Methylenmalonestern, dadurch gekennzeichnet, daß der monomeren Methylenmalonester in einer wäßrigen Gas-gesättigten Pufferlösung, die gegebenenfalls eine oder mehrere oberflächenaktive Substanz(en) enthält, mit einem Rührer dispergiert wird, nach erfolgter Polymerisation die erhaltenen gashaltigen Partikel abtrennt werden, gegebenenfalls mit Wasser gewaschen werden, anschließend in einem pharmazeutisch akzeptablen Suspensionsmedium aufgenommen werden und abschließend gefriergetrocknet werden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 96/00538

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 25242 (SCHERING AG ;STEIN MICHAEL (DE); WEITSCHIES WERNER (DE); FRITZSCH) 23 December 1993 see examples 1-12 see claim 4 ---	1-4
Y	EP,A,0 327 490 (SCHERING AG) 9 August 1989 see examples 2-4 ---	1-4
Y	NATO ASI SER., SER. A, 1994, VOL. 273, PAGES 161-72, XP000574089 BRETON, P. ET AL: "New poly(methylidene malonate 2.1.2) nanoparticles: recent developments" see abstract see page 1270, left-hand column, paragraph 2 --- -/-	1-4



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 June 1996

Date of mailing of the international search report

15.07.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Dullaart, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/00538

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PHARM. RES., vol. 11, no. 9, 1994, pages 1270-1277, XP000574092 LESCURE, FRANCOIS ET AL: "Preparation and characterization of novel poly(methylidene malonate 2.1.2.)-made nanoparticles" see page 161, paragraph 3 ---	1-4
Y	INT. J. PHARM., vol. 92, no. 1-3, 1993, pages 71-79, XP000574094 MBELA, T. K. M. ET AL: "Development of poly(dialkyl methylidenemalonate) nanoparticles as drug carriers" see abstract see "Materials and Methods" ---	1-4
Y	PROC. PROGRAM INT. SYMP. CONTROLLED RELEASE BIOACT. MATER., 18TH, 1991, PAGES 325-6, XP000574090 LESCURE, F. ET AL: "Synthesis and evaluation of a new biodegradable monomer" see "Materials and Methods" see figures 2,3 ---	1-4
Y	INT. J. PHARM., 1992, VOL. 79, NO. 1, PAGES 29-38, XP002006979 MBELA, T. K. M. ET AL: "Poly(diethylmethylidene malonate) nanoparticles as a primaquine delivery system to liver" see abstract see "Materials and Methods" see figure 1 see table 3 ---	1-4
Y	J PHARM SCI, JAN 1991, VOL. 80, NO. 1, PAGE(S) 67-70, XP000168164 DE KEYSER JL ET AL: "Poly(diethyl methylidenemalonate) nanoparticles as a potential drug carrier: preparation, distribution and elimination after intravenous and peroral administration to mice." see abstract see "Experimental Section" see "Conclusions" -----	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/00538

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9325242	23-12-93	DE-A- 4219723	16-12-93
		AU-B- 4323293	04-01-94
		CN-A- 1082924	02-03-94
		EP-A- 0644777	29-03-95
		FI-A- 945837	12-12-94
		HU-A- 69380	28-09-95
		JP-T- 7507780	31-08-95
		NO-A- 944805	12-12-94
		NZ-A- 253115	26-01-96

EP-A-0327490	09-08-89	DE-C- 3803971	07-09-89
		DE-A- 3803972	10-08-89
		AT-T- 109663	15-08-94
		AU-B- 635200	18-03-93
		AU-B- 3035189	25-08-89
		CA-A- 1336164	04-07-95
		WO-A- 8906978	10-08-89
		DE-D- 58908194	22-09-94
		EP-A- 0398935	28-11-90
		EP-A- 0586875	16-03-94
		ES-T- 2068917	01-05-95
		JP-T- 3503634	15-08-91
		PT-B- 89635	28-02-94
		US-A- 5425366	20-06-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/00538

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO,A,93 25242 (SCHERING AG ;STEIN MICHAEL (DE); WEITSCHIES WERNER (DE); FRITZSCH) 23.Dezember 1993 siehe Beispiele 1-12 siehe Anspruch 4 ---	1-4
Y	EP,A,0 327 490 (SCHERING AG) 9.August 1989 siehe Beispiele 2-4 ---	1-4
Y	NATO ASI SER., SER. A, 1994, VOL. 273, PAGES 161-72, XP000574089 BRETON, P. ET AL: "New poly(methylidene malonate 2.1.2) nanoparticles: recent developments" siehe Zusammenfassung siehe Seite 1270, linke Spalte, Absatz 2 --- -/-	1-4

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28.Juni 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15.07.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Dullaart, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PHARM. RES., Bd. 11, Nr. 9, 1994, Seiten 1270-1277, XP000574092 LESCURE, FRANCOIS ET AL: "Preparation and characterization of novel poly(methylidene malonate 2.1.2.)-made nanoparticles" siehe Seite 161, Absatz 3 ---	1-4
Y	INT. J. PHARM., Bd. 92, Nr. 1-3, 1993, Seiten 71-79, XP000574094 MBELA, T. K. M. ET AL: "Development of poly(dialkyl methylidenemalonate) nanoparticles as drug carriers" siehe Zusammenfassung Siehe "Materials and Methods" ---	1-4
Y	PROC. PROGRAM INT. SYMP. CONTROLLED RELEASE BIOACT. MATER., 18TH, 1991, PAGES 325-6, XP000574090 LESCURE, F. ET AL: "Synthesis and evaluation of a new biodegradable monomer" siehe "Materials and Methods" siehe Abbildungen 2,3 ---	1-4
Y	INT. J. PHARM., 1992, VOL. 79, NO. 1, PAGES 29-38, XP002006979 MBELA, T. K. M. ET AL: "Poly(diethylmethylidene malonate) nanoparticles as a primaquine delivery system to liver" siehe Zusammenfassung siehe "Materials and Methods" siehe Abbildung 1 siehe Tabelle 3 ---	1-4
Y	J PHARM SCI, JAN 1991, VOL. 80, NO. 1, PAGE(S) 67-70, XP000168164 DE KEYSER JL ET AL: "Poly(diethyl methylidenemalonate) nanoparticles as a potential drug carrier: preparation, distribution and elimination after intravenous and peroral administration to mice." siehe Zusammenfassung siehe "Experimental Section" siehe "Conclusions" -----	1-4

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/00538

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
WO-A-9325242	23-12-93	DE-A-	4219723	16-12-93
		AU-B-	4323293	04-01-94
		CN-A-	1082924	02-03-94
		EP-A-	0644777	29-03-95
		FI-A-	945837	12-12-94
		HU-A-	69380	28-09-95
		JP-T-	7507780	31-08-95
		NO-A-	944805	12-12-94
		NZ-A-	253115	26-01-96

EP-A-0327490	09-08-89	DE-C-	3803971	07-09-89
		DE-A-	3803972	10-08-89
		AT-T-	109663	15-08-94
		AU-B-	635200	18-03-93
		AU-B-	3035189	25-08-89
		CA-A-	1336164	04-07-95
		WO-A-	8906978	10-08-89
		DE-D-	58908194	22-09-94
		EP-A-	0398935	28-11-90
		EP-A-	0586875	16-03-94
		ES-T-	2068917	01-05-95
		JP-T-	3503634	15-08-91
		PT-B-	89635	28-02-94
		US-A-	5425366	20-06-95

THIS PAGE BLANK (USPTO)